



TITLE:

A sulfated glycosaminoglycan linkage region is a novel type of Human Natural Killer-1 (HNK-1) epitope expressed on aggrecan in perineuronal nets( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Yabuno, Keiko

---

CITATION:

Yabuno, Keiko. A sulfated glycosaminoglycan linkage region is a novel type of Human Natural Killer-1 (HNK-1) epitope expressed on aggrecan in perineuronal nets. 京都大学, 2016, 博士(人間健康科学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19644>

RIGHT:

京都大学	博士（人間健康科学）	氏 名	籾 野 景 子
論文題目	A sulfated glycosaminoglycan linkage region is a novel type of Human Natural Killer-1 (HNK-1) epitope expressed on aggrecan in perineuronal nets (ペリニューロナルネットを構成するアグリカン上には新規 HNK-1 糖鎖が存在する)		
（論文内容の要旨） 神経系は正確な神経回路が構築され、学習記憶等の脳の高次機能が発揮される。しかし、その構造は普遍的なものではなく、外界からの刺激により変化しうる可塑性と呼ばれる柔軟性をもつ。ペリニューロナルネット（PNNs）は抑制性神経細胞周囲に形成される特徴的な網目状の構造体で、約一世紀前よりその存在は知られていたものの、機能については長らく不明であった。近年、PNNs の主要な構成成分であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）上の糖鎖が経験依存的な神経可塑性の調節に重要であることが報告された。一方、PNNs に特徴的に発現する糖鎖の一つに Human Natural Killer-1（HNK-1）糖鎖と呼ばれる糖鎖が存在する。HNK-1 糖鎖は神経系に高発現し、その主要な生合成酵素はグルクロン酸転移酵素 GlcAT-P であることが知られている。しかし、その遺伝子欠損マウス（PKO マウス）の脳内では殆どの HNK-1 糖鎖が消失するものの、PNNs 上の HNK-1 糖鎖は残存した。このことから、PNNs 上には既知の構造とは異なる特殊な HNK-1 糖鎖が存在することが予想された。また、PNNs の HNK-1 糖鎖発現と経験依存的な神経可塑性獲得との間に相関が見られることが報告されている。そこで、本研究では PNNs に発現する HNK-1 糖鎖の機能解明を目的として、PNNs における本糖鎖のキャリアータンパク質の同定及び糖鎖構造解析を行った。  HNK-1 糖鎖のキャリアータンパク質を同定するために PKO マウスの脳より PNNs の構成成分を多く含む可溶性画分を調製し、免疫沈降及びウエスタンブロット解析を行った結果、キャリアータンパク質が CSPG の aggrecan であることを同定した。さらに、生合成経路を明らかにするために、HNK-1 糖鎖生合成に関与するもう一つのグルクロン酸転移酵素である GlcAT-S の遺伝子欠損マウス（SKO マウス）及び GlcAT-P/S 両遺伝子欠損マウス（DKO マウス）を作製した。しかし、どちらの KO マウスでも PNNs 上の HNK-1 糖鎖は消失しなかった。このことから、PNNs 上の HNK-1 糖鎖は従来の生合成酵素とは異なる酵素によって合成されることが示された。GlcAT-P/S と相同性が高いグルクロン酸転移酵素として GlcAT-I が知られている。GlcAT-I はプロテオグリカン上の橋渡し四糖構造（GlcA-Gal-Gal-Xyl）合成酵素の一つで、GlcAT-I の過剰発現により HNK-1 糖鎖の発現が誘導されることが報告されている。そこで、GlcAT-I が内在的に発現しており、GlcAT-P/S が発現していない COS-1 細胞に対して aggrecan と HNK-1 糖鎖生合成に必須の硫酸基転移酵素 HNK-1ST を共に強制発現させたところ、aggrecan 上に HNK-1 糖鎖が生合成された。この結果は、PNNs 上の HNK-1 糖鎖合成には GlcAT-I と HNK-1ST が関与していることを示すものである。さらに液体クロマトグラフ／タンデム質量分析（LC/MS <sup>n</sup> ）により aggrecan 上に合成された HNK-1 糖鎖の構造解析を行ったところ、糖鎖構造は従来のものとは異なる HSO <sub>3</sub> -GlcA-Gal-Gal-Xyl という硫酸化四糖構造であることが明らかとなった。  以上の結果は、従来知られていた HNK-1 糖鎖とは異なる新規 HNK-1 糖鎖が PNNs に発現することを示すものであるとともに、神経可塑性制御における糖鎖の機能解明に繋がる重要な知見である。			

<p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>脳機能の基盤となる神経回路は外界からの刺激により変化する可塑性と呼ばれる柔軟性をもつ。ペリニューロナルネット（PNNs）は特定の神経細胞周囲に形成される機能不明の構造体として約 100 年前に発見された。しかし、近年 PNNs はコンドロイチン硫酸鎖（CS 鎖）などの糖鎖発現を介して神経可塑性制御に関与することが報告され、PNNs における糖鎖の機能が注目を集めている。一方、HNK-1 糖鎖抗原は PNNs の代表的な抗原として知られているが、機能面では不明な点が多い。そこで、本研究では PNNs における HNK-1 糖鎖抗原の機能解析を目的として糖鎖構造の解析とキャリアー分子の同定を中心に研究が行われた。</p> <p>申請者は PNNs における HNK-1 糖鎖のキャリアー分子が aggrecan であることを同定し、培養細胞を用いた実験系で、グルクロン酸転移酵素 GlcAT-I と硫酸基転移酵素 HNK-1ST が PNNs 上の HNK-1 糖鎖生合成酵素であることを明らかにした。さらに、LC/MS 解析の結果、aggrecan 上の HNK-1 糖鎖は従来の構造とは異なる硫酸化四糖構造であることを明らかにした。また、この HNK-1 糖鎖には aggrecan 上の CS 鎖の発現を抑制する機能があることを見出した。</p> <p>以上の研究は神経系における糖鎖の機能を理解する上で重要な知見であり、未解明な点が多い PNNs の可塑性制御機構の解明に寄与することが期待される。</p> <p>したがって、本論文は博士（人間健康科学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 28 年 1 月 29 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
<p>論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。</p> <p>ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。</p> <p>要旨公開可能日：                      年                      月                      日以降</p>